

Biomédica 2003;23:263-73

## ARTÍCULO ORIGINAL

## Identificación de antígenos de aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgG total y subclases

Jenny Fabiola Hernández <sup>1</sup>, Sofía Duque <sup>1,2</sup>, Adriana Arévalo <sup>1</sup>,  
Rafael Guerrero <sup>3</sup>, Rubén Santiago Nicholls <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>2</sup> Unidad de Parasitología, Departamento de Salud Pública y Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>3</sup> Gastroenterología Pediátrica, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia.

Se conocen investigaciones realizadas sobre la respuesta inmune humoral en giardiosis. Sin embargo, estudios sobre perfiles de antígenos de quistes y de trofozoítos de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgG y subclases (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>) anti-*G. duodenalis* no se han realizado en la misma magnitud. Con el fin de determinar los antígenos de los aislamientos colombianos de *G. duodenalis* reconocidos por IgG y sus subclases anti-*G. duodenalis*, se utilizó la metodología de *Western blot*. Quistes y trofozoítos del parásito, independientemente, se sometieron a separación de proteínas mediante SDS-PAGE. Las proteínas separadas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa mediante inmunoelectrotransferencia y su antigenicidad determinada confrontando éstas con IgG y sus subclases anti-*G. duodenalis* presentes en el suero de pacientes con giardiosis comprobada parasitológicamente. La unión antígeno-anticuerpo se detectó con conjugados anti-inmunoglobulina específicos unidos a fosfatasa alcalina, la cual permitió evidenciar los polipéptidos antigénicos cuando se adicionó el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/azul de nitrotetrazolio. Se leyeron y analizaron las bandas mediante análisis de regresión lineal, utilizando el programa Quantity One®. Se reconocieron 32 antígenos, simultáneamente en quistes y trofozoítos de aislamientos colombianos del parásito por IgG total anti-*G. duodenalis*, que oscilaron entre 22-185 kDa y 19 en un rango de 42 a 180 kDa, reconocidos tanto por IgG<sub>1</sub> como por IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis*. Las IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> anti-parásito no reconocieron antígenos en ninguno de los dos estadios. Los antígenos de 27, 30, 31, 33, 45, 49, 57, 78, 89 y 170 kDa son compartidos con aislamientos de *G. duodenalis* circulantes en otras regiones geográficas. El reconocimiento de antígenos de quistes y trofozoítos de los aislamientos colombianos de *G. duodenalis* por IgG, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis* de pacientes infectados sugiere que los antígenos del parásito originan respuesta inmune humoral en el hospedero.

**Palabras clave:** giardiosis, antígenos, inmunoglobulina G, subclases de IgG, antígenos, inmunoelectrotransferencia.

### Antigen identification of *Giardia duodenalis* Colombian isolates recognized by total IgG and its subclasses

Antigen profiles were described for *Giardia duodenalis* cysts and trophozoites that are recognized by IgG and its anti-*G. duodenalis* subclasses (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>). Antigens were identified by Western blot from *G. duodenalis* cyst and trophozoite isolates. Cysts and trophozoites were each subjected to protein separation by SDS-PAGE. The proteins were then transferred to nitrocellulose membranes by electroimmunoblot, and their antigenicity was determined by exposing them to sera from patients with confirmed diagnosis of *G. duodenalis* infection. The antigen-antibody reaction was revealed by specific alkaline phosphatase antibody conjugates against IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>; bands were visualized by addition of the substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and the stain nitro blue tetrazolium. The bands were read and analyzed by linear regression using Quantity One® software. Thirty two antigens were simultaneously recognized by total IgG anti-*G. duodenalis* in the cyst and trophozoite stages.

The antigens varied in molecular weight from 22 to 185 kDa. Nineteen antigens were identified by both IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis*, with molecular weights ranging from 42 to 180 kDa. IgG<sub>2</sub> and IgG<sub>4</sub> did not identify any antigen in either stage. The antigens of molecular weights 27, 30, 31, 33, 45, 49, 57, 78, 89 and 170 kDa are shared with *G. duodenalis* isolates from other geographical regions of Colombia. The recognition of cyst and trophozoite antigens of Colombian *G. duodenalis* isolates by IgG, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis* suggested that they are involved in the induction of the host immune response.

**Key words:** giardiasis, antigens, IgG, IgG subclasses, antigenic determinants, Western blot.

La giardiosis es la infección intestinal causada por el protozoo flagelado *Giardia lamblia*, también conocido como *Giardia intestinales* o *Giardia duodenalis*, la cual puede afectar al humano y producir comensalismo en mamíferos, reptiles y aves (1). La mayoría de las infecciones humanas causadas por *G. duodenalis* son asintomáticas; cuando no lo son se encuentran asociadas con diarrea, dolor abdominal, flatulencia y, en algunos casos, con síndrome de malabsorción (2). El humano desarrolla respuesta inmune humoral y celular a la infección por el parásito. Sin embargo, la protección inmune no ha sido demostrada conclusivamente en la giardiosis humana (3).

La respuesta inmune en giardiosis ha sido demostrada por evidencias tales como: 1) la autolimitación de la infección; 2) la participación de monocitos citotóxicos en la modulación de la respuesta inmune; 3) los pacientes inmunocomprometidos son más susceptibles a la infección, especialmente aquéllos con hipogammaglobulinemia; 4) en áreas endémicas, las personas que las habitan son menos susceptibles a la infección que los visitantes; 5) las infecciones crónicas en animales atímicos o tratados con medicamentos inmunosopresores, y 6) la detección de anticuerpos anti-*G. duodenalis* en suero de pacientes infectados por *G. duodenalis* (2).

Las investigaciones serológicas en giardiosis han demostrado ventajas prácticas en el diagnóstico debido a que los anticuerpos específicos contra

*G. duodenalis* se detectan en pacientes asintomáticos, sintomáticos y en pacientes con excreción intermitente de quistes (4). Así, estudios previos demuestran que después de una infección se producen anticuerpos; los de IgM son los primeros en aparecer y se mantienen elevados entre dos y tres semanas (5). Los anticuerpos IgA permanecen elevados aún después de haberse tratado la infección (6) y los anticuerpos IgG se detectan en el 80% de los pacientes, respuesta que puede persistir por largos períodos (7).

Diferentes grupos de investigadores han tratado de identificar antígenos de *G. duodenalis* reconocidos por anticuerpos específicos (8). Uno de ellos analizó 4 aislamientos de *G. duodenalis* cultivados *in vitro*, provenientes de humanos de varias regiones geográficas, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sin encontrar diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, al confrontar los antígenos reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros humanos mediante ELISA, observaron que la respuesta humoral estaba dirigida a antígenos específicos y que existía variabilidad genética entre los aislamientos de *G. duodenalis*.

La variación antigénica en giardiosis ha sido demostrada *in vitro* (9) e *in vivo* (10). La mayoría de los estudios han utilizado el aislamiento WB de *G. duodenalis* proveniente de pacientes sintomáticos de Afganistán y han demostrado que la variación antigénica ocurre frecuentemente en la superficie de los trofozoítos de aislamientos de *G. duodenalis* (1,11).

Igualmente se ha informado que los antígenos de *G. duodenalis* más frecuentemente involucrados en el desarrollo de estos anticuerpos poseen pesos moleculares de 30, 57, 82, 88 y 170 kDa.

Correspondencia:

Sofía Duque, Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 No 51-60, Bogotá, D.C., Colombia  
Teléfono: 2207700, extensión 455; Fax :2200901  
sduque@ins.gov.co

Recibido: 20/11/02; aceptado: 23/05/03

Muchos de éstos corresponden a proteínas de la superficie o a estructuras del disco ventral y del citoesqueleto de *G. duodenalis* (12). En 1993, Hill recomendó realizar estudios para analizar el papel de estos antígenos en la inmunidad o en la infección por *G. duodenalis* (13).

El conocimiento de la composición de los antígenos del parásito y el papel que juegan en la respuesta inmune durante la infección en giardiosis sería importante para comprender la patogénesis de la enfermedad. Igualmente, la identificación de antígenos reconocidos por el sistema inmune del hospedero es de interés para entender la modulación de la infección por *G. duodenalis* (14).

No se conocen los antígenos de quistes y trofozoítos de aislamientos colombianos de *G. duodenalis* reconocidos por IgG y subclases anti-*G. duodenalis* de pacientes con giardiosis comprobada parasitológicamente. El presente estudio se realizó con la finalidad de identificar los antígenos de aislamientos colombianos de *G. duodenalis* estimuladores del desarrollo de la IgG y sus subclases.

## Materiales y métodos

### Sueros

Las 161 muestras de suero humano utilizadas en el estudio fueron suministradas por el banco de muestras del Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS). A las muestras de suero se les había determinado, previamente, la ausencia de anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* mediante inmunodifusión (14) y la presencia o ausencia de IgG anti-*G. duodenalis* por ELISA (15).

Los sueros se clasificaron de la siguiente manera:

**Grupo A.** Controles positivos: 72 sueros de pacientes con giardiosis comprobada parasitológicamente por medio de la visualización de quistes o trofozoítos del parásito y por la presencia de IgG anti-*G. duodenalis* en suero.

**Grupo B.** 20 sueros de pacientes con sospecha clínica de giardiosis y positivos parasitológicamente con parásitos intestinales diferentes a *G. duodenalis* y con presencia de IgG anti-*G.*

*duodenalis* en suero. A estos pacientes se les confirmó parasitológicamente la ausencia de quistes o trofozoítos de *G. duodenalis* y la presencia de *Endolimax nana*, *Blastocystis hominis*, *Iodamoeba butschlii*, *Entamoeba coli*, complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Trichomonas hominis* y uncinarias, y serológicamente por inmunodifusión, la ausencia de anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* y por ELISA la presencia de anti-*G. duodenalis*.

**Grupo C.** Controles negativos: 69 sueros de pacientes sin giardiosis sometidos a pruebas parasitológicas y serológicas para confirmar la ausencia de *G. duodenalis* y otros parásitos intestinales en meconio de neonatos y heces de adulto y sin detección de IgG anti-*G. duodenalis* en suero.

Los controles negativos se dividieron en dos subgrupos: uno con 49 muestras de cordón umbilical de neonatos, recién cortado y eliminado, de diferentes edades gestacionales y otro con 20 sueros de adultos sin giardiosis.

### Quistes y trofozoítos de *Giardia duodenalis*

Una mezcla de quistes y uno de trofozoítos de *G. duodenalis* de 24 aislamientos se obtuvieron del banco de muestras del Laboratorio de Parasitología del INS. Cada mezcla había sido previamente elaborada con una población de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml en solución reguladora de fosfatos (PBS) (15).

### Preparación de antígeno de quistes y trofozoítos de *Giardia duodenalis*

Los quistes y trofozoítos del parásito se congelaron de manera independiente a  $-196^\circ\text{C}$  y se descongelaron a temperatura ambiente mediante agitación vórtex. La congelación y descongelación se realizó 3 veces consecutivas. Se centrifugaron a  $2.000\text{ g}/4^\circ\text{C}$  por 10 minutos y se conservó el sobrenadante (antígeno). La concentración de proteínas existente en el antígeno se determinó mediante el método de Bradford (16).

### Separación de proteínas de quistes y trofozoítos de *giardia* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó, de forma independiente, la separación de proteínas de los estadios según el método

descrito por Laemmli, 1970 (17), así: se elaboró un gel concentrador y uno separador de poliacrilamida en concentraciones de 4% y 10%, respectivamente. Se adicionaron a los geles los marcadores de peso molecular y las diluciones de antígeno de quistes y trofozoítos, tanto en ausencia como en presencia de 2-mercaptoetanol (2-ME), en un rango de 0,4-1,2 mg/ml. Se realizó la electroforesis a 18 °C/35 mA/75 voltios/3 vatios de potencia por 1 hora y 10 minutos. Se colorearon los geles con azul de Coomassie por 1 minuto. El exceso de colorante se retiró sumergiendo los geles en solución decoloradora de etanol-ácido acético (3:1).

#### **Identificación de antígenos de quistes y trofozoítos de *Giardia duodenalis* mediante inmuno-electrotransferencia**

El reconocimiento de antígenos de quiste y trofozoíto de *G. duodenalis* se realizó mediante el procedimiento descrito por Towbin *et al.* (18).

Se transfirieron las proteínas de quistes y trofozoítos separadas mediante SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa (MNC) a 4 °C/200 mA/130 voltios/26 vatios por 2 horas. Se verificó la transferencia de las proteínas coloreando la MNC con rojo Ponceau S. Se observó que la concentración de 0,8 mg/ml de proteína de quiste y de trofozoíto era la óptima cuando se confrontaba con IgG total anti-*G. duodenalis* y de 1,2 mg/ml cuando se enfrentaba con IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> anti-*G. duodenalis*.

Se bloqueó la MNC a 18 °C por 1 hora con leche descremada al 4% disuelta en solución reguladora de fosfatos más Tween 20 al 0,1% (PBS-T) y se lavó 3 veces con PBS-T por 5 minutos cada vez.

Se agregaron a la MNC diluciones de las muestras de suero de pacientes para el reconocimiento de antígenos de quistes y trofozoítos por IgG total anti-*G. duodenalis* y de las subclases de IgG. Las muestras se incubaron a 18 °C por 18 horas. La dilución óptima de suero fue de 1:100 para IgG total y de 1:20 para las subclases de IgG. Se lavó la MNC como se describió anteriormente. Se incubó la MNC a 18 °C por 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:500 y 1:250 de anti-IgG y anti-IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> humana unida a

fosfatasa alcalina (Bio-Rad), respectivamente. Se lavó la MNC 2 veces con PBS-T y una vez con solución reguladora Tris-NaCl-MgCl. Se reveló la reacción con 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato (BCIP) y azul de nitrotetrazolio (NBT).

#### **Análisis de resultados**

Se realizó la lectura y análisis de las bandas utilizando el programa Quantity One®, mediante análisis de regresión lineal para determinar el perfil de proteínas de quistes y de trofozoítos de aislamientos colombianos de *G. duodenalis* y el perfil de antígenos de quistes y de trofozoítos de aislamientos de *G. duodenalis* reconocidos por IgG total y las subclases de IgG anti-*G. duodenalis* de pacientes con giardiasis comprobada parasitológicamente.

A partir del perfil de antígenos de quistes y de trofozoítos de aislamientos del parásito reconocidos por IgG total y las subclases de IgG anti-*G. duodenalis*, se establecieron las frecuencias de reconocimiento de cada uno de los antígenos y el número de antígenos reconocidos simultáneamente.

#### **Resultados**

##### **Discriminación diagnóstica de antígenos de quistes y trofozoítos**

*Pacientes con giardiasis comprobada parasitológicamente.* Se reconocieron 33, 27 y 23 antígenos en quistes de aislamientos colombianos de *G. duodenalis* por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis*, respectivamente (figura 1, cuadro 1).

Se reconocieron 33, 24 y 21 antígenos en trofozoítos de aislamientos colombianos de *G. duodenalis*, por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis*, respectivamente (figura 1, cuadro 1).

Ningún antígeno en ninguno de los dos estadios del parásito fue reconocido por IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub>.

Los antígenos de 22, 23, 26, 27, 30, 31, 33, 35, 38, 42, 43, 45, 49, 52, 57, 60, 62, 65, 68, 72, 75, 78, 82, 89, 99, 110, 133, 145, 155, 170, 180 y 185 kDa fueron reconocidos por IgG total anti-*G. duodenalis* tanto en quistes como en trofozoítos de los aislamientos colombianos del parásito (figura 1, cuadro 1).

Los polipéptidos antigénicos de 42, 43, 49, 52, 57, 60, 62, 65, 68, 75, 78, 82, 89, 99, 110, 133, 145, 170 y 180 kDa fueron reconocidos, simultáneamente, por las subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis* en quistes y trofozoítos de los aislamientos del parásito (figura 1, cuadro 1).

**Pacientes con sospecha clínica de giardiasis, otras parasitosis intestinales y presencia de IgG y subclases de IgG ANTI-*G. duodenalis*.** Se reconocieron antígenos de quistes y trofozoítos de *G. duodenalis* de pesos moleculares entre 25-241 kDa por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis* (figura 1, cuadro 1).

Las IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis* reconocieron 22, 12 y 16 antígenos de quistes de aislamientos del parásito, respectivamente. Estas mismas inmunoglobulinas reconocieron 20, 22 y 16 antígenos en trofozoítos de los aislamientos nativos del parásito, respectivamente (figura 1, cuadro 1).

**Pacientes sin giardiasis.** En el grupo de 49 neonatos utilizados como controles negativos ningún antígeno de quistes ni de trofozoítos de

*G. duodenalis* fue reconocido por anticuerpos IgG y subclases anti-parásito (figura 1).

En los sueros de los controles negativos provenientes del subgrupo de adultos, la IgG total reconoció antígenos de 38, 82, 99, 155, 200 y 241 kDa y sus subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> reconocieron los de 38, 82 y 200 kDa y el de 200 kDa, respectivamente (figura 1).

Los antígenos de 82 y 200 kDa fueron reconocidos en trofozoítos por IgG total, en tanto las subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> no reconocieron ningún antígeno en este estadio (figura 1).

#### **Frecuencia de reconocimiento de antígenos (kDa) de quistes y trofozoítos por IgG y subclases de IgG de pacientes con giardiasis comprobada parasitológicamente**

Las frecuencias de reconocimiento fueron entendidas como el resultado porcentual del número total de sueros con presencia de anticuerpos anti-*G. duodenalis* (numerador) y el número de ellos que reconocieron un determinado antígeno (denominador).



**Figura 1.** Discriminación diagnóstica.

**A.** Antígenos de quistes de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis*. Grupo A, carriles 1-2, antígenos reconocidos por IgG total; 3-4, antígenos reconocidos por IgG<sub>1</sub>; 5-6, antígenos reconocidos por IgG<sub>3</sub>. Grupo B, carriles 7-8, antígenos reconocidos por IgG total; 9-10, antígenos reconocidos por IgG<sub>1</sub>; 11-12, antígenos reconocidos por IgG<sub>3</sub>. Grupo C, neonatos, carril 13, antígenos reconocidos por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>; adultos, carriles 14-15, antígenos reconocidos por IgG total; 16-17, antígenos reconocidos por IgG<sub>1</sub>; 18, antígenos reconocidos por IgG<sub>3</sub>.

**B.** Antígenos de trofozoítos de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis*. Grupo A, carriles 1-2, antígenos reconocidos por IgG total; 3-4, antígenos reconocidos por IgG<sub>1</sub>; 5-6, antígenos reconocidos por IgG<sub>3</sub>. Grupo B, carriles 7-8, antígenos reconocidos por IgG total; 9-10, antígenos reconocidos por IgG<sub>1</sub>; 11-12, antígenos reconocidos por IgG<sub>3</sub>. Grupo C, neonatos, carril 13, antígenos reconocidos por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>; adultos, carriles 14-15, antígenos reconocidos por IgG total; 16, antígenos reconocidos por IgG<sub>1</sub>; 17, antígenos reconocidos por IgG<sub>3</sub>.

Las frecuencias de reconocimiento de antígenos de quistes por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> oscilaron en un rango de 1% a 65%, de 1% a 71% y de 1% a 72%, respectivamente (cuadro 1). Estas

frecuencias para el caso de los trofozoítos en este mismo grupo de inmunoglobulinas fueron de 1% a 47%, de 1% a 68% y de 1% a 85%, respectivamente (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Antígenos de quistes (Q) y trofozoítos (T) reconocidos por IgG total (IgG<sub>T</sub>), IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-*G. duodenalis* y sus frecuencias de reconocimiento por los sueros de los pacientes de los grupos A y B.

ANTIGENO PM Kda	GRUPO A						GRUPO B					
	IgG <sub>T</sub> %		IgG <sub>1</sub> %		IgG <sub>3</sub> %		IgG <sub>T</sub> %		IgG <sub>1</sub> %		IgG <sub>3</sub> %	
	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T
20		4										
22	1	3										
23	3	6										
25					5					5		
26	1	3								5		
27	1	11	1									
29	4											
30	6	4	1				15	5		15		
31	11	13	1	1						5		
33	7	1					15	20		15		
35	11	15	6	4	1		5			5		30
38	10	26	10	1			15	10	10	5	25	
40								15	5	30	25	
42	15	11	22	1	3	3						
43	28	10	15	29	25	6	5		65	20	30	40
45	11	18	19	7	7		5	20	15	35	25	50
48												5
49	31	24	35	33	14	11	20	10	5	40	15	
52	29	42	28	39	39	74	10	10		55	20	
57	31	25	18	26	33	4	30	10	20	45	35	55
60	17	22	13	28	11	19		30				
62	26	18	25	19	56	65	5	25	5		15	5
65	22	47	24	24	26	10				50		45
68	8	19	8	1	1	10						
69							10			35	10	30
72	10	38	17	11	13							
74										20		10
75	17	13	22	24	33	14	10	30			35	
78	8	18	26	43	18	57	10	5	65	50		15
82	22	10	24	7	14	11	20	25				
89	11	24	19	13	29	3						
94										25		
99	24	32	32	57	43	28	15	20		40	20	100
105										25		
110	57	13	38	19	44	58	25	35	85		45	
129										55		45
133	28	40	31	6	32	1	30	30				
145	50	29	47	68	53	85	15	5	75	15	50	45
155	8	7	21		17	1	40	60		75	25	60
170	65	33	25	4	28	14						
180	36	33	71	38	72	69	60	25	100		70	
185	40	38				1	10	55	75		55	
200												
220												10
241												45
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>33</b>	<b>27</b>	<b>24</b>	<b>23</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>12</b>	<b>22</b>	<b>16</b>	<b>16</b>

**Frecuencia de reconocimiento de antígenos de quistes.** La IgG anti-*G. duodenalis* reconoció los antígenos de 110, 145 y 170 kDa en 57%, 50% y 65%, respectivamente. Treinta polipéptidos antigénicos del total de los 33 identificados por la inmunoglobulina fueron reconocidos entre 1% y 40%.

La subclase IgG<sub>1</sub> reconoció el antígeno de 145 kDa en el 47% y el de 180 kDa en el 71%. Veinticinco antígenos de los 27 identificados por la inmunoglobulina fueron reconocidos entre 1% y 38%.

La IgG<sub>3</sub> reconoció los antígenos de 62, 99, 110, 145 y 180 kDa en el 56%, 43%, 44%, 53% y 72%, respectivamente. Dieciocho de los 23 antígenos identificados por la inmunoglobulina fueron reconocidos entre 1% y 39%.

Ningún antígeno fue reconocido en quiste con una frecuencia igual o superior al 80%.

**Frecuencia de reconocimiento de antígenos de trofozoítos.** La IgG anti-*G. duodenalis* reconoció el antígeno de 52 kDa en el 42% y el de 65 kDa en el 47%. Treinta y uno de los 33 antígenos identificados por la inmunoglobulina fueron reconocidos entre el 1% y el 40%.

La IgG<sub>1</sub> reconoció los antígenos de 78, 99 y 145 kDa en el 43%, 57% y 68%, respectivamente. La inmunoglobulina no reconoció antígenos con frecuencias mayores del 80%.

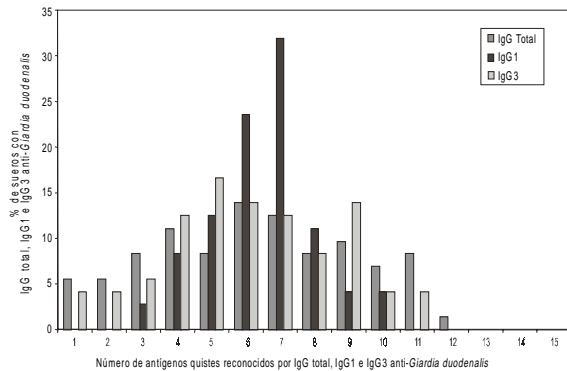
La IgG<sub>3</sub> reconoció polipéptidos antigénicos de 52, 62, 78, 110 y 145 kDa en el 74%, 65%, 57%, 58% y 85%, respectivamente. La inmunoglobulina tan sólo reconoció un antígeno en el 85%.

**Número de antígenos de quistes y trofozoítos reconocidos simultáneamente por IgG y subclases anti-*G. duodenalis* de pacientes con giardiosis comprobada parasitológicamente**

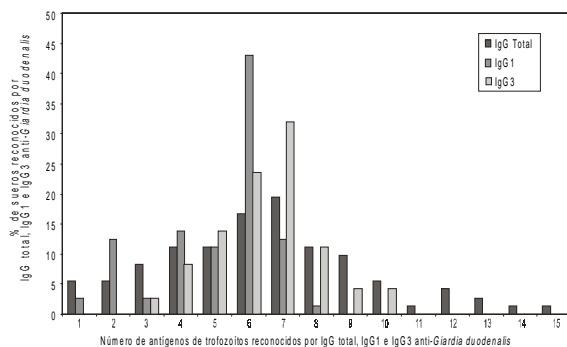
El número de antígenos de quistes reconocidos simultáneamente por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> varió de 1 a 12, de 3 a 10 y de 1 a 11, respectivamente (figura 2).

El número de polipéptidos antigénicos de trofozoítos reconocidos simultáneamente por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> varió de 1 a 15, de 1 a 8 y de 1 a 10, respectivamente (figura 3).

**IDENTIFICACION DE ANTIGENOS DE *G. DUODENALIS* POR IgG**



**Figura 2.** Comparación del número de antígenos de quistes de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> de pacientes con giardiosis comprobada parasitológicamente.



**Figura 3.** Comparación del número de antígenos de trofozoítos de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> de pacientes con giardiosis comprobada parasitológicamente.

El mínimo de antígenos reconocidos simultáneamente por IgG total en quistes y trofozoítos fue de 1 y el máximo de 12 y 15, respectivamente.

Un mínimo de 3 y 1 y un máximo de 10 y 8 polipéptidos antigénicos de quistes y trofozoítos, respectivamente, fueron identificados simultáneamente por IgG<sub>1</sub>.

El mínimo de antígenos reconocidos simultáneamente en quistes y trofozoítos por IgG<sub>3</sub> fue de 1 y 3 y el máximo de 11 y 10, respectivamente.

**Discusión**

Las IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> reconocieron antígenos de quistes y trofozoítos, en tanto que las subclases IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> no reconocieron ningún polipéptido antigénico.

Los antígenos de *G. duodenalis* fueron realmente reconocidos por inmunoglobulinas anti-*G. duodenalis*, lo que puede señalarse porque la especificidad del *Western blot* utilizado en el estudio quedó demostrada por la confirmación parasitológica de la ausencia de *G. duodenalis* y otros parásitos intestinales en meconio de neonatos y en heces de adultos sanos y la confirmación serológica de la no detección de IgG total anti-*G. duodenalis* en muestras de neonato y de adultos sin giardiosis.

Adicionalmente, no sería prudente afirmar que los antígenos del parásito reconocidos por sueros de pacientes con otras parasitosis intestinales y sospecha clínica de giardiosis sean inespecíficos. Esto porque, aunque parasitológicamente no se hubiesen observado quistes o trofozoítos de *G. duodenalis* en las heces de los pacientes, no se puede asegurar que no hubiesen estado en contacto con el parásito en algún momento de su vida y desarrollado anticuerpos anti-*G. duodenalis*, como se confirmó serológicamente. Aún más, se conoce que *E. histolytica* puede ser invasivo en el hospedero y *G. duodenalis* puede estar en contacto con el huésped en el intestino delgado. Por ello, son parásitos intestinales que pueden inducir respuesta humoral en el hospedero (19,20). En cambio *E. coli*, *E. nana*, *I. butschlii*, *T. hominis*, uncinarias y *B. hominis* no inducen respuesta inmune y, por ende, ninguna producción de anticuerpos (21).

La IgG total reconoció antígenos de quistes y trofozoítos utilizando concentraciones de 0,8 mg/ml, que es equivalente a 16 mg/20 ml al adicionado a cada carril del gel de poliacrilamida. Esta concentración es mayor en 6 mg/ml y menor en 24 mg/ml a las utilizadas por Janoff *et al.* (22), Soliman *et al.* (23) y Taylor y Wenman (24), respectivamente.

Los antígenos, independientemente del estadio, cualitativamente presentaron heterogeneidad en la tonalidad de coloración. Esto se debió, quizás, a las diferencias que puedan existir en avidéz y afinidad de los anticuerpos presentes en el suero del hospedero. Se conoce que la unión antígeno-anticuerpo es una función tanto de la avidéz como de la concentración del anticuerpo (25,26).

La IgG total reconoció 33 antígenos tanto en quistes como en trofozoítos. El antígeno de 29 kDa sólo fue reconocido en quistes y es propio de la pared (27) y el de 20 kDa es parte del citoesqueleto, estructura propia de los trofozoítos (28).

Erlandsen *et al.* informaron antígenos de 29, 75, 88 y 102 kDa detectados por anticuerpos policlonales, desarrollados en conejos contra quistes de *Giardia muris* (27). Faubert (11), corroboró los hallazgos de Gillin *et al.* (29), quienes identificaron antígenos de quistes de *G. duodenalis* de 21, 28, 36 y 49 kDa, también reconocidos por anticuerpos policlonales desarrollados en conejo.

En los aislamientos colombianos de *G. duodenalis* los antígenos del parásito fueron reconocidos por IgG anti-*G. duodenalis* detectada en suero humano. El antígeno de 29 kDa sólo fue reconocido en quistes, los de 49 y 75 kDa en quistes y trofozoítos y los de 88 y 102 kDa en ninguno de los estadios. Se ha informado que el quiste da origen al trofozoíto, quizá por ello el antígeno de 75 kDa y, muy probablemente (aunque aún sin confirmar en la literatura científica), el de 49 kDa sean identificados en ambos estadios. Se conoce por los estudios de localización ultraestructural que los antígenos de 29, 75, 88 y 102 kDa se encuentran asociados con los filamentos de la superficie externa de los quistes y con los filamentos estructurales de los trofozoítos en su proceso de enquistamiento (27).

Los antígenos de trofozoítos que fueron reconocidos por IgG total, con pesos moleculares de 20, 22, 23, 26, 35, 38, 42, 43, 52, 60, 62, 65, 68, 72, 75, 99, 110, 133, 145, 155, 180 y 185 kDa, todavía no han sido reconocidos en aislamientos de *G. duodenalis* circulantes en otras regiones geográficas. Ello sugiere la variabilidad que existe entre los diferentes aislamientos de *G. duodenalis* (30).

Bienz *et al.* (31) informaron que durante la infección *G. duodenalis* sufre variación antigénica y la habilidad del parásito para alterar las proteínas antigénicas de superficie se ha demostrado en varios estudios. Aún más, la composición y complejidad de aislamientos de *G. duodenalis*



pueden estar asociadas con aspectos de la relación hospedero-parásito (32).

Antígenos de trofozoítos del parásito han sido reconocidos por IgG total. Así, los de 27, 31 y 33 kDa han sido informados por Taylor y Wenman (24); el de 30 kDa por Janoff *et al.* (22); los de 30, 31, 57, 89 y 170 kDa por Char *et al.* (33); los de 49 y 78 kDa por Reiner y Gillin (34), y los de 31, 45 kDa y 170 kDa por Char *et al.* (35). Ello permite inferir que los antígenos de trofozoítos de aislamientos colombianos de *G. duodenalis* de 27, 30, 31, 33, 45, 49, 57, 78, 89 y 170 kDa son compartidos con aislamientos de *G. duodenalis* circulantes en otras regiones geográficas.

Las subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> reconocieron, simultáneamente, 18 antígenos con pesos moleculares entre 42 y 180 kDa. El antígeno de 49 kDa es el único común con respecto a los siete, de 25, 33, 49, 56, 64, 103 y 113 kDa, identificados por las mismas inmunoglobulinas e informados por Soliman *et al.* (23). La IgG<sub>1</sub> reconoció los polipéptidos antigénicos de 27 y 30 kDa solamente en quistes y la IgG<sub>3</sub> el de 185 kDa sólo en trofozoítos.

Se conoce que diferentes subgrupos de células T producen citocinas que al parecer afectan la producción de subclases de inmunoglobulina G. Así, los linfocitos T ayudadores TH<sub>2</sub> producen interleucina 4 e inducen respuestas de tipo IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> (36). Las subclases de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> son las inmunoglobulinas que fácilmente fijan el complemento, y la IgG<sub>3</sub> es la más hábil en la fijación de éste, lo cual ha sido comprobado *in vitro* al observar la lisis de los trofozoítos de *G. duodenalis* (37,38). La subclase IgG<sub>1</sub> se desarrolla como una respuesta a la presencia de antígenos polipeptídicos (39) y la IgG<sub>3</sub> a antígenos que contienen carbohidratos, especialmente en bacterias patógenas (40). Algunos autores piensan que la lisis de protozoos y bacterias patógenas en el intestino puede ser mediada por la IgG<sub>3</sub>, tal vez porque se ha comprobado *in vitro* que ésta aglutina trofozoítos del parásito, los cuales posteriormente son lisados en presencia del complemento (23,37,38).

Quizá el reconocimiento de los antígenos de 27, 30 y 31 kDa por IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> se deba a su mayor antigenicidad que estimula aún más a los linfocitos

TH<sub>2</sub> para el desarrollo de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> anti-*Giardia*. Las subclases IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub>, cuya respuesta está regulada por interferón gamma producido por los linfocitos T ayudadores, TH<sub>1</sub> (36), y que tienen una menor capacidad de fijar el complemento (41), no reconocieron antígenos ni en quistes ni en trofozoítos. En 1998, Soliman *et al.* (23) no confrontaron anticuerpos IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> anti-*Giardia* en suero con el trofozoíto del parásito para detectar proteínas antigénicas.

Las IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> reconocieron antígenos de bajo y alto peso molecular en ambos estadios de los aislamientos. Estudios de otros autores informan que constituyen parte de la superficie de los trofozoítos del parásito los antígenos de 29 y 75 kDa (42), 30, 38 y 180 kDa (43), 31 y 33 kDa (22,24), 49 kDa (44), y 170 kDa (12). Los polipéptidos antigénicos localizados en el flagelo de los trofozoítos han sido los de 30 kDa (28), 155 y 170 kDa (45). Los antígenos que se han encontrado en el citoesqueleto son los de 29, 30, 31 y 60 kDa (28), 155 y 170 kDa (45); el grupo entre 30-33 kDa es característico de las giardinas que se encuentran en el disco ventral. El antígeno de 57 kDa (33) conforma el citosol, el de 49 kDa (34) es un antígeno constitutivo, el de 65 kDa (46) es antígeno de excreción/secreción y el de 78 kDa (34), un antígeno regulador.

Los antígenos de quistes y trofozoítos de 52, 62, 78, 110 y 145 kDa fueron reconocidos, al menos, por una de las tres inmunoglobulinas (IgG total, IgG<sub>1</sub> o IgG<sub>3</sub>) con frecuencias de 81,9%; 77,8%; 94,4% y 70,8%; 93,1%, y 98,6%, respectivamente. Este hallazgo es importante y permite proponer la posibilidad de utilizarlos en conjunto para el desarrollo de inmunoensayos que detecten anticuerpos IgG anti-*G. duodenalis* en suero.

Se sugiere que antes de concretar esta posibilidad, y dada su importancia epidemiológica, sería relevante estudiar el período durante el cual los anticuerpos IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> permanecen en el hospedero después de la resolución de la infección.

### Agradecimientos

Financiado por el Instituto Nacional de Salud-Colciencias bajo el proyecto de investigación con código 2104-04-10151 del 2000.

## Referencias

1. **Adam RD.** Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 2001;14:447-75.
2. **Guimarães S, Sogayar MIL, Franco M.** *Giardia duodenalis*: inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. Rev Inst Med Trop S Paulo 1999;41:45-58.
3. **Eckmann L, Gillin FD.** Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;280:G1-G6.
4. **Haralabidis ST.** Immunodiagnosis of giardiasis by ELISA and studies on cross-reactivity between the anti-*Giardia lamblia* antibodies and some heterologous parasitic antigens and fractions. Ann Trop Med Parasitol 1984;78:295-300.
5. **Goka AKJ, Rolston DDK, Mathan VI, Farthing MJG.** Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunosorbent assay. Lancet 1986;ii:184-6.
6. **O'Shea-Alvarez MS, González-Robles A, Chavez B, Cedillo-Rivera R.** Ultrastructural localization of *Giardia lamblia* antigens by human IgA and IgG. Arch Med Res 1994;25:407-12.
7. **Smith PD, Gillin FD, Brown WR, Nash TE.** IgG antibody to *Giardia lamblia* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Gastroenterology 1981;80:1476-80.
8. **Smith PD, Gillin FD, Kaushal NA, Nash TE.** Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon. Infect Immun 1982;36:714-9.
9. **Nash TE, Aggarwal A, Adam DR, Conrad JT, Merritt JW.** Antigenic variation in *Giardia lamblia*. J Immunol 1988;141:636-41.
10. **Aggarwal A, Nash TE.** Antigenic variation of *Giardia lamblia* in vivo. Infect Immun 1988;56:1420-3.
11. **Faubert GM.** Immune response to *Giardia duodenalis*. Clin Microbiol Rev 2000;13:35-54.
12. **Rosales-Borjas DM, Díaz-Rivadeneira J, Doña-Leyva A, Zambrano-Villa SA, Mascaró C, Osuna A, et al.** Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. Infect Immun 1998;66:756-9.
13. **Hill DR.** Giardiasis. Issues in diagnosis and management. Infect Dis Clin North Am 1993;7:503-25.
14. **Ouchterlony O.** Diffusion in gel methods for immunological analysis. Proc Allergy 1958;5:1.
15. **Duque S, Nicholls RS, Arévalo A, Guerrero R.** Serodiagnóstico de giardiasis: identificación de inmunoglobulina G anti-*Giardia duodenalis* en suero mediante ELISA. Biomédica 2001;21:228-33.
16. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
17. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
18. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-4.
19. **Young JD, Young TM, Lu LP, Unkeless JC, Cohn ZA.** Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. J Exp Med 1982;156:1667-90.
20. **Wolfe MS.** Giardiasis. Clin Microbiol Rev 1992;5:93-100.
21. **Manson-Bahr PEC, Bell DR.** Manson's Tropical diseases. 19<sup>th</sup> ed. London: Baillière Tindall; 1987.
22. **Janoff EN, Smith PD, Blaser MJ.** Acute antibody responses to *Giardia lamblia* are depressed in patients with AIDS. J Infect Dis 1988;157:798-804.
23. **Soliman MM, Taghi-Kilani R, Ahmed FA, Abou- Shady AFA, El-Mageid SAA, Handousa AA, et al.** Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. Am J Trop Med Hyg 1998;58:232-9.
24. **Taylor GD, Wenman WM.** Human immune response to *Giardia lamblia*. J Infect Dis 1987;155:137-40.
25. **Venkatesan P, Wakelin D.** ELISAs for parasitologist: or lies, damned lies and ELISAs. Parasitol Today 1993;9:228-32.
26. **Renart J, Behrens MM, Fernández-Renart M, Martínez JL.** Immunoblotting techniques. En: Diamandis EP, Christopoulos TK, editors. Immunoassay. San Diego: Academic Press; 1996. p.537-54.
27. **Erlandsen SL, Bemrick WJ, Schupp DE, Shields JM, Jarroll EL, Sauch JF, et al.** High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. J Histochem Cytochem 1990;38:625-32.
28. **Crossley R, Holberton DV.** Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. J Cell Sci 1985;59:81-103.
29. **Gillin FD, Reiner DS, Gault MJ, Douglas H, Das S, Wunderlich A, et al.** Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. Science 1987;235:1040-3.
30. **Faubert GM, Belosevic M.** Animal models for *Giardia duodenalis* type organisms. En: Meyer EA, editor. Human parasitic diseases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers Biomedical Division; 1990. p.77-90.

31. **Bienz M, Wittwer P, Zimmermann V, Müller N.** Molecular characterization of a predominant antigenic region of *Giardia lamblia* variant surface protein H7. *Int J Parasitol* 2001;31:827-32.
32. **Guimarães S, Sogayar MIL, Franco M.** Analysis of proteins from membrane and soluble fractions of *Giardia duodenalis* trophozoites of two Brazilian axenic strains. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002;44:239-44.
33. **Char S, Shetty N, Narasimba M, Elliot E, Macaden R, Farthing MJG.** Serum antibody response in children with *Giardia lamblia* infection and identification of an immunodominant 57-kilodalton antigen. *Parasite Immunol* 1991;13:329-37.
34. **Reiner DS, Gillin FD.** Human secretory and serum antibodies recognize environmentally induced antigens of *Giardia lamblia*. *Infect Immun* 1992;60:637-43.
35. **Char S, Cevallos AM, Yamson P, Sullivan PB, Neale G, Farthing MJG.** Impaired IgA response to *Giardia* heat shock antigen in children with persistent diarrhoea and giardiasis. *Gut* 1993;34:38-40.
36. **Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW.** *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol* 1993;32:71-160.
37. **Belosevic M, Faubert GM, Dharampaul S.** Antimicrobial action of antibodies against *Giardia muris* trophozoites. *Clin Exp Immunol* 1994;95:485-9.
38. **Heyworth MR.** Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. *J Parasitol* 1992;78:73-6.
39. **Stevens R, Dichek D, Keld B, Heiner D.** IgG<sub>1</sub> is the predominant subclass of *in vivo* and *in vitro*-produced anti-tetanus toxoid antibodies and also serves as the membrane IgG molecule for delivering inhibitory signals to anti-tetanus toxoid antibody-producing cells. *J Clin Immunol* 1983;3:65-9.
40. **Perlmutter RP, Hansburg D, Briles DE, Nicilotti RA, Davie JM.** Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. *J Immunol* 1978;121:566-72.
41. **Roitt IM.** Essential immunology. 8<sup>th</sup> ed. London: Blackwell Scientific Publications; 1994.
42. **Clark JT, Holberton DV.** Plasma membrane isolated from *Giardia lamblia*: identification of membrane proteins. *Eur Cell Biol* 1986;42:200-6.
43. **Einfeld DA, Stibbs HH.** Identification and characterization of a major surface antigen of *Giardia lamblia*. *Infect Immun* 1984;46:377-83.
44. **Das S, Traynor-Kaplan A, Reiner DS, Meng TC, Gillin FD.** A surface antigen of *Giardia lamblia* with a glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem* 1991; 266:21318-23.
45. **Torian BE, Barnes RC, Stephens RS, Stibbs HH.** Tubulin and high-molecular-weight polypeptides as *Giardia lamblia* antigens. *Infect Immun* 1984;46:152-8.
46. **Rosoff JD, Stibbs HH.** Physical and chemical characterization of *Giardia lamblia*-specific antigen useful in the coprodiagnosis of giardiasis. *J Clin Microbiol* 1986; 24:1079-83.